Aus der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der
Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H. Schuermann

Über die Dichte der Spermatozoen im Hoden und über die Gewinnungsmöglichkeiten von Hodenspermatozoen

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Werner Große Segerath
aus Oberhausen - Osterfeld

Würzburg 1956

Aus der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der
Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H. S c h u e r m a n n

Über die Dichte der Spermatozoen im Hoden und über die Gewinnungsmöglichkeiten von Hodenspermatozoen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Werner Große Segerath
aus Oberhausen - Osterfeld

Würzburg 1956

Tag der mündl. Prüfung:
16. Juli 1956

Referent: Professor Dr. med. H. S c h u e r m a n n

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Meinen Eltern in Dankbarkeit

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Über die Dichte der Spermatozoen im Hoden und über die Gewinnungsmöglichkeiten von Hodenspermatozoen

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Die Spermatozoenzahl in Ejakulaten und deren Bedeutung für die Befruchtung	3
	a) Beim Menschen	3
	b) Bei Tieren	7
III.	Bisherige Untersuchungen über die Dichte von Hodenspermatozoen	12
IV.	Eigene Untersuchungen	14
	a) Untersuchungsmaterial	14
	b) Präparationsmethode	14
	c) Gewinnungsmethode	15
	d) Auszählungsmethode	16
	e) Fehlerquellen und Fehlerberechnung	17
V.	Untersuchungsergebnisse	20
	1) Die Zahl der Spermatozoen aus Hodenpräparaten von Meerschweinchen ohne und mit Ausschüttelung	20
	2) Feststellung der Zahl der Spermatozoen durch Ausschütteln und Auszählen des Filtrierungsrückstandes	22
	3) Unterschied zwischen der Spermatozoendichte im Rete testis, in der Peripherie des Hodens und im Nebenhoden bei der Ratte	25

Seite

4) Unterschied zwischen der Spermatozoendichte im Rete testis, in der Peripherie des Hodens und im Nebenhoden bei Meerschweinchen 26

5) Feststellung des Ausbeutegrades bei 1/4, 1/2 und 1/1 Hoden von Meerschweinchen 27

6) Feststellung des Ausbeutegrades bei 1/8, 1/4 und 1/2 Hoden von Hunden 28

7) Anzahl der gewonnenen Spermatozoen bei verschiedenen Verdünnungen aus 1/2 Meerschweinchenhoden und 1/8 Hundehoden 29

8) Anzahl der gewonnenen Spermatozoen bei verschiedenen Verdünnungen unter Berücksichtigung des Hodengewichtes beim Meerschweinchen 31

9) Anzahl der gewonnenen Spermatozoen bei verschiedenen Verdünnungen unter Berücksichtigung des Hodengewichtes bei Hunden 32

10) Auszählung von 1/8, 1/4 und 1/2 Hundehoden unter Berücksichtigung von Gewicht und Hodenteil 33

VI. Zusammenfassung 35

VII. Literaturverzeichnis 40

I. Einleitung

Nachdem der Arzt und Bürgermeister von Arnheim, J. H a m m (um 1651 - 1730), erstmalig Spermatozoen als "neuartige Lebewesen" erkannt hatte, erschloß er damit ein neues großes Forschungsgebiet. H a m m teilte seine Entdeckung dem damals im Mikroskopieren erfahrenen L e e u w e n h o e k mit, der dann genauere Untersuchungen anstellte. L e e u w e n h o e k gewann als erster Samenzellen aus extirpierten Hunde-, Kaninchen- und Hühnerhoden und untersuchte sie. Auch veröffentlichte er schon Angaben über die Spermatozoenzahl in Ejakulaten. So schreibt L e e u w e n h o e k , daß die Anzahl der Samentierchen, die er mit bis zu 270facher Vergrößerung untersuchte, im Ejakulat eines Fisches (Asellus major) größer sei als die Einwohnerzahl der Erde. Pro Gesichtsfeld wurden ca. 50 000 Spermien festgestellt, wobei die Samenzellen kleiner seien als die roten Blutkörperchen und im Volumen eines Hirsekornes etwa eine Milliarde Platz hätten. Endlich ergaben vergleichende Untersuchungen schon damals, daß die Größe der Samentierchen bei den verschiedenen Tierklassen nicht proportional ihrer Körpergröße sei (J o & l). 1780 wurden von dem Abt S p a l l a n z a n i quantitative Experimente darüber angestellt, wieviel Samenflüssigkeit notwendig sei, um Amphibieneier zu befruchten. Dabei stellte es sich heraus, daß die Samenflüssigkeit selbst in extremen Verdünnungen noch aktiv ist, jedoch die prozentuale Anzahl der befruchteten Eier nach und nach vermindert wurde.

Jedoch verneinte S p a l l a n z a n i die schon damals vertretene Meinung, daß die Samentierchen das Wesentliche für die Befruchtung seien und war vielmehr der Auffassung, daß die Flüssigkeit auch nach Abtötung der Samenzellen noch voll wirksam sei.

1824 brachten P r é v o s t und D u m a s dann erst den Beweis, daß die Spermatozoen der wesentliche Bestandteil des Samens sind. Sie wiederholten S p a l l a n z a n i s Versuche an Amphibien mit größerer Präzision, indem sie die Anzahl der Spermatozoen und Eier bestimmten. In einer Versuchsreihe wurden z.B. 225 Spermatozoen und 380 Eier geschätzt, wobei 61 befruchtet wurden.

Nachdem K o e l l i k e r um 1845 genauere Angaben über die Samentierchen und deren Funktion gemacht hatte, stellte der Berliner Histologe R e i c h e r t eine neue Theorie auf. Er behauptete, daß die Spermatozoen lediglich der Durchmischung und Konstanterhaltung der gleichmäßigen Beschaffenheit des Spermas dienten und daß ihre Dichte in der Samenflüssigkeit in gar keiner Beziehung zur Fertilität des Individuums steht. K o e l l i k e r dagegen hielt den Spermatozoenkopf für das Wichtigste bei der Befruchtung.

L o d e wandte 1891 zum ersten Mal zur genaueren Feststellung der Spermatozoendichte im Ejakulat die Zählkammer für rote Blutkörperchen an und fand mit ungefähr 61 000 000 Spermatozoen pro ccm Ejakulat eine Zahl, die auch heute noch ihre Gültigkeit hat.

II. Die Spermatozoenzahl in Ejakulaten und deren Bedeutung für die Befruchtung

a) Beim Menschen

Über die Spermatozoenzahl im Sperma sowie ihre Bedeutung für die Befruchtung gehen die Meinungen der verschiedenen Autoren stark auseinander. Einen Überblick über die Vielzahl der Meinungen soll die folgende Tabelle vermitteln:

Autor	Spermat. Zahl pro ccm i.Mill.	Durchschnitt in Mill./ccm	Mindestzahl f. eine Befrucht.i.Mill./ccm
Serge u. Valle	100 - 400		100
Knaus	60 - 120		60
Belonoschkin	60 - 90		30
McLeod und Gold		90	20
Schultze			4,5
Hotchkiss Brunner u. Grenley	2,8 - 2330		2,8
Hotchkiss	2,0 - 450		2,0
Joël	1,0 - 9,0		1,0
Morikard		100	4,0
Saunders		46	
Belding		100	
Barton und Wiesner	4,0 - 21		
Lode		18 - 20	
Meaker		100	
Jackson u. Harvey			unter 20
Kennedy, Richards u. Bishop		60	über 20

Diese unterschiedlichen Forschungsergebnisse mögen einmal an der Schwierigkeit liegen, alle für die Spermatozoenzahl ausschlaggebenden Faktoren genau zu erfassen, zum anderen aber auch an der Unmöglichkeit, gleiche Untersuchungsbedingungen zu schaffen. Die Angaben sind also nur in bestimmten Grenzen miteinander vergleichbar. So produzieren Männer verschiedenen Alters verschieden viel Spermatozoen - nach K n a u s erzeugt der Mensch zwischen 15 und 20 Jahren die meisten Samenzellen - und zum anderen dürfte auch die Konstitution, der Typus und die geschlechtliche Betätigung eine wesentliche Rolle spielen.

Nicht nur die Zahlenangaben, sondern auch ihre Bewertung für die Befruchtung sind sehr unterschiedlich. H o t c h k i s s erklärt die stark auseinandergehenden Meinungen über die zur Konzeption nötige Spermatozoenzahl mit mehr oder minder großer Empfängnisbereitschaft der Frau. Eine bestimmte Spermatozoenkonzentration, die bei einer Frau eine Konzeption bewirkt, braucht kein Beweis dafür zu sein, daß dieselbe Anzahl auch bei einer anderen Frau zum Erfolg führt. Jedoch besteht kein Zweifel darüber, daß hohe Zahlen günstiger sind und leichter zur Konzeption führen als Ejakulate, die weniger Spermien enthalten.

Auf der Suche nach dem Grund für die großen Schwankungen bei den Spermatozoenzahlen finden wir bei H o t c h k i s s einen weiteren Hinweis: Er konnte zwar keine jahreszeitbedingte Schwankung der Spermatozoenzahl feststellen, jedoch fand er bei Versuchen mit M c L e o d , daß die Zahl der Samenzellen bei Überhitzung des Skrotums (40,5 - 41°C) nach 25 bis 55 Tagen abnimmt und ca. 32 Tage anhält.

M c L e o d und G o l d fanden nach Untersuchung von 1 000 fertilen Männern ein mittleres Ejakulatvolumen von 3,4 ccm (durchschnittliche Abweichung 1,9 ccm) und als mittleres Volumen bei 1 000 infertilen Männern 3,7 ccm (durchschnittliche Abweichung 1,7 ccm). Bei größerer Flüssigkeitsmenge war jedoch der Samengehalt niedriger. Bei Spermatozoenzahlen unter 20 Mill. pro ccm besteht ein deutlicher Unterschied zwischen fertilen und infertilen Männern. In dieser Gruppe stellten sie 5 % fruchtbare und 16 % unfruchtbare Personen fest. Von den letzteren hatten 9 % unter 10 Mill./ccm, dagegen nur 2 % von den fertilen. Die meisten unfruchtbaren Patienten hatten Spermatozoenzahlen unter 20 Mill., die meisten fruchtbaren 60 bis 80 Mill./ccm. Bei diesen Angaben wurden die männlichen Partner in einer unfruchtbaren Ehe als infertil angenommen, ohne zu berücksichtigen, daß ein gewisser Prozentsatz der Frauen die Schuld an der Kinderlosigkeit trägt. M c L e o d und G o l d sind der Meinung, daß 60 Mill. Spermatozoen als Norm zu hoch gegriffen sei und haben durch ihre Veröffentlichungen gezeigt, daß fast 30 % der von ihnen untersuchten Männer Spermatozoenzahlen unter 60 Mill./ccm hatten. Sorgfältige Wiederholungsversuche bestätigten sehr deutlich, daß die unterste Grenze für eine Befruchtung bedeutend niedriger als 60 Mill./ccm liegt. Weiter erkannten sie, daß ein Ejakulat mit 140 Mill.Sperm./ccm keinen höheren Fertilitätsgrad besitzt als ein solches mit nur 40 Mill./ccm und daß bei infertilen Männern die Spermatozoendichte um so geringer sei, je grösser das Volumen des Ejakulats ist. Bezüglich des Volumens folgern M c L e o d und G o l d noch aus ihren Untersuchungen, daß

1) bei allen Volumina die Spermatozoendichte bei fertilen Männern größer ist als bei nicht zeugungsfähigen, 2) bei Volumina unter 3,4 ccm die Zahlendifferenzen zwischen den fertilen und infertilen Männern nicht sonderlich markant ist und 3) der Zahlenunterschied bei Volumina über 3,4 ccm zwischen den beiden eben genannten Gruppen sehr deutlich erscheint. Nach M c L e o d und G o l d kann ein Mann nicht als infertil betrachtet werden, solange sich noch ein einziges Spermatozoon in seinem Ejakulat befindet, wobei natürlich die Chancen für eine Befruchtung mit wachsender Samenzellenzahl steigen. K e n n e d y , R i c h a r d s und B i s h o p untersuchten 226 Fälle, die sie in drei Gruppen einteilten. Zu der ersten Gruppe gehörten alle die Patienten, in deren Ejakulat mehr als 60 Mill. Sperm. pro ccm gefunden wurden. Sie werden als fertil angesehen. Zur zweiten Kategorie, die als infertil bezeichnet wird, gehören die Männer mit einer Spermatozoenzahl von 0 bis 20 Mill./ccm und die dritte oder subfertile Gruppe umfaßt alle diejenigen, deren Spermatozoenzahl zwischen 20 und 60 Mill./ccm liegt. Ihnen wird eine reelle Chance gegeben, die Vaterschaft zu erlangen.

Nach K n a u s kann eine geringere Spermatozoendichte pro ccm durch ein größeres Gesamtvolumen kompensiert werden und L o d e vermerkt, daß sich die Spermatozoenzahl nach sexuellen Erregungen steigert. M e a k e r konnte bei Spermatozoenzahlen unter 60 Mill./ ccm keine Schwangerschaft mehr beobachten, nach S t i a s n y dagegen befinden sich normalerweise im menschlichen Ejakulat 18 - 20 Mill. Sperm./ccm bei einem Gesamtvolumen von 5 ccm.

Interessant ist noch die Mitteilung von J a c k s o n und H a r v e y , die bei vierzehn Männern mit weniger als 20 Mill. Sperm./ccm noch eine normale Zeugungsfähigkeit beobachten konnten. J o e l stellte sogar noch Konzeptionen bei Spermatozoendichten zwischen 5 und 30 Mill./ccm fest.

M o e n c h mißt der Zahl nur eine geringe Bedeutung bei und hält die Morphologie der Spermatozoen für einen weitaus bedeutenderen Faktor.

b) Bei Tieren

Die Schwankungsbreiten bei den Angaben über die Spermatozoenzahl in Tierejakulaten sind nicht ganz so groß wie die beim Menschen. Dieses liegt wohl in der Hauptsache daran, daß die Versuchstiere leichter kontrollierbar sind. Auch hier soll zunächst eine Tabelle eine Übersicht über die Untersuchungsergebnisse verschiedener Autoren an Bullenspermatozoen geben:

Autor	Mill. Sperm./ccm	Durchschnitt in Mill.
Lagerlöf	300 - 2 000	800
Milovanow	300 - 3 000	1 000
Davis und Williams	800 - 2 000	734
Herman und Ragsdale	360 - 1 950	
Anderson	50 - 2 000	600 - 900

In einer weiteren ergänzten Tabelle nach G o e t z e finden wir Angaben über Ejakulate verschiedener Tierarten und zum Vergleich den Menschen:

Tierart	Farbe	Konsistenz	Größe des Ejakulats in ccm			Zahl der Spermatozoen / ccm in Mill.			Gesamtzahl der Spermatozoen im Ejakulat in Mrd.			p.H.
			Min.	Mittel	Max.	Min.	Mittel	Max.	Min.	Mittel	Max.	
Bulle	weißlich elfenbeinf. manchmal mehr gelb od. grünlich	rahmartig träge tropfbar bis milchwasserähnlich	1,5	4 - 5	12	0,4	0,8 bis 1,2	6	0,6	2 - 6	36	6,6 bis 7,4
Schaf und Ziegenbock	weißlich elfenbeinf. manchmal mehr gelb	rahmartig träge tropfbar bis milchwasserähnlich	0,5	1,25	3,5	0,8	2 - 5	8	0,4	3 - 8	15	6,5 bis 7,2
Hengst	grauweisslich	wässerig tropfbar mit Schleim in verschiedener Menge	40	80 bis 120	480	0,04	0,08 bis 0,2	0,8	0,6	6,0	48	7,0 bis 7,6
Eber	milchigweiß	wässerig tropfbar mit stärkekleisterähnlichen Flocken	100	200 bis 400	1000	0,05	0,1 bis 0,4	1,0	1,5	20 bis 120	300	7,2 bis 7,8
Mensch	weißlich elfenbeinf.	träge tropfbar schleimartig	3	4,5	6	0,02	0,06	0,12				

Lambert und McKenzie geben eine Spermatozoenkonzentration im Hundeejakulat von 1 000 bis 9 000 Mill./ccm an. Diese großen Schwankungen versuchte Alifanow dadurch zu erklären, daß er die zu untersuchenden Hunde in drei Gruppen einteilte:

a) in solche, die augenblicklich zur Paarung bereit waren,
b) in solche, die es erst nach einem Zeitraum von einigen Stunden versuchten und endlich
c) in solche, die das Weibchen vollständig ignorierten.

Die Auszählung des in der künstlichen Vagina gesammelten Ejakulates ergab für die Gruppe a) 2,7 ccm mit einer Spermatozoenkonzentration von 189 Mill./ccm. Bei der Gruppe b) waren es 2 ccm und 74 Mill. Spermatozoen/ccm, und die Untersuchung der Gruppe c) ergab 1,5 ccm und 14 Mill./ccm. Außerdem stellten sie fest, daß das Sperma ununterbrochen produziert wird und die normale Konzentration nach einer oder mehreren Ejakulationen in einem Intervall von 24 bis 72 Stunden wiederhergestellt ist. Bei der Betrachtung all dieser Untersuchungsergebnisse erkennt man, daß immer wieder auf die große Schwankungsbreite hingewiesen wird. Zwischen dem pH-Wert des Ejakulats und der Zahl der Spermatozoen pro ccm wurde ein Zusammenhang festgestellt, wobei der pH um so niedriger lag, je höher die Spermatozoenkonzentration war (Schneerson, Davis und Williams, Davis, Underbjerg und Williams). Weiterhin bestehen auch markante Beziehungen zwischen dem pH-Wert und Volumen des Ejakulats und dem pH und der Motilität der Spermatozoen (Davis und Williams, Anderson). Je niedriger der pH, desto größer die Dichte, desto höher der Motilitäts-

grad der Spermatozoen und desto größer das Volumen des Ejakulats (A n d e r s o n).

E d w a r d s erkannte bei Kaninchenejakulaten eine Beziehung zwischen dem Gewicht der Hodensubstanz und der Anzahl der Spermatozoen, welche von ihr produziert werden. Nach einseitiger Kastration konnte er weder eine kompensatorische Hypertrophie des Hodens, noch der spermiogenetischen Funktion feststellen. Bei unseren Versuchen wurde diese Erkenntnis der positiven Beziehung zwischen Gewicht der Hodensubstanz und Zahl der Spermien, welche von ihr produziert werden, berücksichtigt. Sie fand auch für den Hoden ihre Bestätigung.

Aufschlußreiche Versuche über die Gewinnung von Nebenhodenspermatozoen zur künstlichen Insemination wurden von W a l t o n angestellt. Versuchskaninchen wurden durch Nackenschlag getötet und die Hoden entfernt. Durch Zerschneiden des Nebenhodenschwanzes und Aufschwemmung in 5 ccm 0,15 M NaCl Lösung, wurde eine dichte Spermatozoensuspension hergestellt und im Mikroskop die Motilität der Samenfäden geprüft. In einer Reihe von 7 Reagenzgläsern (A, B, C etc.) wurden nun je 18 ccm einer 0,15 M NaCl Lösung gefüllt und 2 ccm der Spermatozoensuspension dann mit der im Röhrchen A befindlichen Lösung vermischt. Darauf wurden 2 ccm von A zu B gegeben und so weiter bis zum Ende der Serie, so daß jede folgende Lösung eine Konzentration von 1/10 der vorhergehenden besitzt. Auf diese Weise erhielt er Lösungen mit absteigender Spermatozoenkonzentration. Eine grobe Schätzung der Dichte wurde durch Vergleich der Trübung der Suspension angestellt. Um die systematischen Fehler zu vermeiden, variierte

W a l t o n die Reihenfolge, in der die Lösungen gebraucht wurden, oder aber es wurde abwechselnd eine hohe und eine niedrige Konzentration genommen. Die künstliche Insemination wurde bei Zimmertemperatur ausgeführt und gleich danach jeweils die Spermatozoendichte mittels eines Haemozytometers bestimmt. Nach W a l t o n betrug der Einheitsfehler der Proben $\pm\sqrt{m}$, wobei m die Anzahl der gezählten Spermatozoen sein soll. Um die Einheitlichkeit der Methode zu prüfen, wurden einige unabhängige Schätzungen von ein und derselben Suspension angefertigt. Fehler, die aus der Methode entstanden, waren gering im Vergleich zu den großen Unterschieden zwischen den angewandten Verdünnungen. Von den verwendeten Spermatozoensuspensionen konnten nur solche zwischen 10^5 bis 10^7 Sperm./ccm direkt geschätzt werden, da oberhalb oder unterhalb dieser Anzahl die Schwierigkeiten der Bestimmung sehr groß werden. Eine Schätzung wurde also nur von den in dieser Hinsicht günstigen Konzentrationen angestellt, und die anderen wurden je nach dem Verdünnungsgrad als Vielfache dieser Zahlen angenommen. Aus der folgenden zusammengefaßten Tabelle gehen W a l t o n s Versuchsergebnisse deutlich hervor:

	Anzahl der Spermatozoen pro 3 ccm Suspension, welche Häsinnen intravaginal gespritzt wurden						
	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
insgesamt befruchtet		14	19	27	28	30	12
mit Erfolg		0	1	6	14	19	7
in Prozent		0	5,5	22,2	50,0	63,6	58,4

Diese Ergebnisse sind schon deshalb sehr aufschlußreich, da sie Angaben über den Wirkungsgrad der Spermatozoen in verschiedenen Dichten geben. Eine kritische Betrachtung dieser Ergebnisse zeigt, daß nach W a l t o n s Untersuchungen offensichtlich eine große Anzahl von Spermatozoen bei einer Intravaginal-Insemination notwendig ist, um eine Befruchtung aussichtsreich zu machen. Das Optimum liegt hier bei einer Spermiendichte von 10^8 pro 3 ccm oder 30 Mill./ccm. Es steht jedoch zu vermuten, daß bei einer Uterus-Insemination schon geringere Spermatozoendichten zum Erfolg führen, da hierbei die Samenzellen nicht den Abwehrkräften der Vagina ausgesetzt sind. W a l t o n kommt zu dem Schluß, daß die Fertilität durch die Dichte oder Anzahl der Spermatozoen, die man in die Vagina einführt, beeinflußt wird, daß die prozentuale Fertilität bei einem Abfall der Spermiendichte unter 10^6 pro 3 ccm reduziert wird und daß die Infertilität bei einer Anzahl unter 10^4 pro 3 ccm eintritt.

II. Bisherige Untersuchungen über die Zahl und Dichte von Hodenspermatozoen

In der Literatur finden sich nur wenige Angaben über die Zahl von Hodenspermatozoen. Z ä h l e stellte Untersuchungen in dieser Richtung bei Bullenhoden an. Durch Aufschneiden und Aufziehen der aus dem Hodenparenchym austretenden Flüssigkeit in eine Mischpipette wurde die zur Auszählung benötigte Spermatozoensuspension gewonnen. Dabei kam es offensichtlich nicht darauf

an, möglichst viele Spermatozoen zu gewinnen, sondern nur die Spermiendichte in den einzelnen Abschnitten des Hodens festzustellen. Die von Z ä h l e angewandte Methode war für unsere Untersuchungen bei Ratten, Meerschweinchen und Hunden unbrauchbar, da bei diesen Tieren nicht genug Flüssigkeit aus dem aufgeschnittenen Hoden quillt, um sie für unsere Fragestellung praktisch verwerten zu können. Die Untersuchungen in dieser Hinsicht an Menschenhoden verliefen ebenfalls negativ, oder aber die Ausbeute an Spermatozoen war so niedrig, daß sie für unsere Versuche nicht verwertet werden konnten (0,1 bis 0,5 Mill. Sperm/ccm). Z ä h l e fand durchschnittlich folgende Werte für Hoden und Nebenhodenabschnitte:

	Mill. Sperm. pro ccm
Hoden	10,893
Nebenhodenkopf	159,2
Nebenhodenkörper	1 094,2
Nebenhodenschwanz	3 624,0
Ejakulat	375,0

Diese aus nur 25 Bullenhoden gewonnenen Auszählungsergebnisse sind umgerechnet und beziehen sich ursprünglich auf 1 cmm Samenflüssigkeit, da für die Auszählungen nicht mehr gewonnen wurde. Weiterhin sei darauf hingewiesen, daß sich nach G o e t z e beim Bullen 100 bis 500 mal mehr Spermatozoen finden als im menschlichen Sperma.

IV. Eigene Untersuchungen

a) Untersuchungsmaterial

Für unsere Versuchsreihen, die in Zusammenarbeit mit D o e p f m e r durchgeführt wurden, verwendeten wir Ratten, Meerschweinchen und Hundehoden. Dabei dienten die Ratten und Hunde vergleichenden Untersuchungen. Die Meerschweinchen- und Rattenspermatozoen waren für die Versuche besonders geeignet, da sie bedeutend größer sind als die menschlichen. Insgesamt wurden für diese Arbeit die Hoden von 152 Tieren - in der Hauptsache von Meerschweinchen - untersucht und ausgewertet. Es wurden nur Meerschweinchen mit einem Mindestalter von fünf Monaten und einem Gewicht zwischen 500 und 800 Gramm genommen, um noch nicht geschlechtsreife Tiere auszuschalten. Weiterhin wurde darauf geachtet, daß die Versuchstiere nicht mit Weibchen zusammenkamen und unter gleichen Bedingungen lebten.

b) Präparationsmethode

Getötet wurden die Ratten durch Schädelschlag, die Meerschweinchen durch Nackenschlag und die Hunde mittels Luftembolie. Dabei konnte beobachtet werden, daß einige Tiere in der Agonie ejakulierten. Diese Feststellung wird in der Fehlerbesprechung noch erwähnt. Die Präparation erfolgte bei den verschiedenen Tierarten in gleicher Weise.

Aus dem geschlachteten Tier wurden die Hoden samt Nebenhoden sowie einem Teil der samenabführenden Wege entfernt. Nun wurde der Nebenhoden sehr sorgfältig vom Hoden präpariert, wobei wir

darauf achteten, daß nicht der geringste Teil des Nebenhodens verblieb. Sodann wurde der Hoden mit physiologischer NaCl-Lösung abgespült, um noch etwaige, an der Oberfläche haftende Nebenhodenspermatozoen zu beseitigen.

c) Gewinnungsmethode

Die ersten Untersuchungen galten der Feststellung einer geeigneten Gewinnungsmethode. In der Literatur sind darüber bisher nur wenige Angaben zu finden, und diese sind außerdem für unsere Fragestellung z.T. unbrauchbar (Z ä h l e). Unsere Untersuchungen galten der Gewinnung möglichst vieler Spermatozoen unter größtmöglichster Schonung der Samenzellen. Die Frage, ob und wieweit die Spermien bei der jeweiligen Gewinnungsmethode aus dem Hodenparenchym geschädigt wurden, konnte durch Parallelversuche von D o e p f m e r geklärt werden. Nach zahlreichen Gewinnungsversuchen wählten wir folgendes Verfahren: Das Hodengewebe wurde mit einer Schere durch eine stets gleichbleibende Anzahl von fünfzig Schnitten mechanisch zerkleinert. Die so gewonnene Hodenmasse schwemmten wir nun mit physiologischer NaCl-Lösung auf und filtrierten sie nach leichtem Umschwenken bzw. 15 min. Schütteln auf einer Rotationsschüttelmaschine durch einen doppelten Mullfilter. Der im Mull verbliebene Rückstand wurde gleichmäßig stark ausgedrückt. Physiologische NaCl-Lösung verwendeten wir deshalb als Ausschwemmungsflüssigkeit, weil sie im Gegensatz zu anderen Lösungen keine Agglutination der Spermatozoen bewirkt und dadurch der Verteilungsfehler möglichst klein gehalten wird. Die auf diese Weise gewonnene trübe Sper-

matozoensuspension konnte nun untersucht werden. Um den Grad der Ausbeute bei diesem Gewinnungsverfahren festzustellen, wurde der auf dem Filter verbliebene Rückstand erneut mit Suspensionsflüssigkeit versetzt, fünfzehn Minuten auf der Rotationsschüttelmaschine ausgeschwenkt und wiederum gefiltert. Über die Ergebnisse der Auszählungen wird später berichtet werden.

Von der in der Literatur häufig erwähnten Methode der Hodenpunktion nahmen wir Abstand, nachdem die in dieser Richtung angestellten Versuche bei Menschenhoden nur zu ungenügenden Ergebnissen führten. Zur Erprobung der Hodenpunktion wurden 1,8 mm Strauß'sche Kanülen sowie 0,8 mm Injektionskanülen verwendet. Das Punktat wurde mit 0,1 ccm physiol. NaCl-Lösung aus den Kanülen gespült und unverdünnt in der Bürker'schen Zählkammer ausgezählt. Dabei fanden sich in den 0,1 ccm Spermatozoensuspension zwischen 40 000 und 60 000 Spermatozoen. Die Punktionsergebnisse schwankten sehr stark, da die Höhe der gewonnenen Spermatozoen von der Anzahl der angestochenen Tubuli abhängt. Außerdem legen sich meistens bei der Aspiration Gewebsteile vor die Kanülenöffnung und verhindern dadurch die Punktion.

d) Auszählungsmethode

Zur Auszählung der Spermatozoensuspension verwendeten wir die Bürker'sche Zählkammer. Das Präparat wurde zunächst gut durchgeschüttelt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Spermatozoen zu erreichen. Nun wurde in eine Leukozytenpipette bis zur Marke 1 aufgezogen und bis zur Marke 11 mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt. Der Inhalt der Pipette wurde wiederum gut

durchgeschüttelt und nach Ablassen von drei Tropfen ein Tropfen unter das mit zwei Klammern fixierte Deckglas der Zählkammer gegeben. Ausgezählt wurden jeweils 2 x 25 1/25 mm große Quadrate und das Ergebnis mit 50 000 multipliziert. Außerdem wurde der größte Teil der Auszählungen von einem zweiten Untersucher mitgezählt, um auf diese Weise den individuellen Fehler so klein wie möglich zu halten. Gezählt wurden alle Spermatozoen, auch solche, an denen noch ein Protoplasmatropfen haftete. Nicht berücksichtigt blieben jedoch die Zellen der Samenreifungsreihe.

e) Fehlerquellen und Fehlerberechnung

Zahlreiche Fehlerquellen, die die Genauigkeit unserer Untersuchungen beeinträchtigen, waren zu berücksichtigen. Diese Fehler, die wir zwar kennen, jedoch nicht vollkommen ausmerzen können, gilt es so klein wie möglich zu halten. Relativ leicht war es, die groben B e o b a c h t u n g s f e h l e r , die durch fehlerhaftes Ablesen bzw. Auszählen entstehen können, auszuschalten, da sie in der Reihe der Untersuchungsergebnisse durch abnorme Werte auffallen. Um dem P r ä p a r a t i o n s f e h l e r , der bei der Bereitung der Spermatozoensuspension z.B. durch verschieden starkes Ausdrücken des Filtrierungsrückstandes auftreten kann, entgegenzuwirken, wurden alle Präparate von ein und demselben Untersucher angefertigt. Diejenigen Tiere, welche in der Agonie ejakuliert hatten, wurden besonders gekennzeichnet. Es stellte sich jedoch kein wesentlicher Unterschied der Zahl bei den Hodenspermatozoen heraus im Vergleich zu denen,

welche nicht ejakuliert haben. Anders war es bei der Spermienzahl des Nebenhodens dieser Tiere. Diese Tatsache wurde in den Tabellenberücksichtigt. Um den P i p e t t e n f e h l e r zu vermeiden, der durch Pipetten mit nicht vollkommen gleichem Volumen auftreten kann, eichten wir vor Beginn der Versuche unsere Leukozytenpipetten und benutzten dann nur noch diese geeichten Instrumente. Ebenso achteten wir auf die feste Auflage des Deckglases, damit die vorgesehene Kammerhöhe von 0,1 mm gewährleistet war. Eine weitere - gegenüber den anderen relativ große - Fehlerquelle ist der i n d i v i d u e l l e F e h l e r , der durch nicht vermeidbare Ungenauigkeiten beim Abmessen und Auszählen entsteht. Um die ungefähre Größe dieses Fehlers zu bestimmen und um diesen später bei der Auswertung der Zählungsergebnisse berücksichtigen zu können, wurde ein Hundehoden präpariert und von zwei Untersuchern insgesamt sechzigmal ausgezählt. Dabei wurde für jede Auszählung neu in die Pipette aufgezogen und verdünnt. Die wiederholte Auszählung ein und desselben Präparates, von dem wir wissen, daß ihm eine ganz bestimmte Anzahl Spermatozoen/ccm zukommt, ergibt mehr oder weniger voneinander abweichende Auszählungsergebnisse.

Diese, den individuellen Fehler charakterisierenden Schwankungen werteten wir mit der Fehlerberechnungsformel nach B u r n aus und erhielten folgende Werte:

Mittelwert $M = \frac{m1 + m2 + m3 + \ldots m_n}{n}$

$M = \frac{178,0}{60} = 2,96$ Mill.

n = Anzahl der Einzelmessungen

m = Wert der Einzelmessung

Mittlerer Fehler der Einzelmessung $f_m = \sqrt{\frac{\Sigma(f^2)}{n-1}}$

$\Sigma(f^2) = (f_1)^2 + (f_2)^2 + (f_3)^2 + \ldots\ldots\ldots (f_n)^2$

$f_m = \sqrt{\frac{6,45}{59}} = \sqrt{0,11} = 0,332$; $f_m = 0,332$ Mill.

Mittlerer Fehler des Mittelwertes $F_m = \sqrt{\frac{\Sigma(f^2)}{n-1}} = \sqrt{\frac{6,54}{3540}}$

Endergebnis $E_m = M \pm F_m$; $E_m = 2,96 \pm 0,001847$

$E_{m1} = 2,961\,847$ Mill.

$E_{m2} = 2,958\,153$ Mill.

Nach dieser Fehlerberechnung beträgt also der mittlere Fehler der Einzelmessung rund 330 000 und der mittlere Fehler des Mittelwertes rund 2 000 Spermatozoen. Das Endergebnis gibt die mittlere Schwankungsbreite der Auszählungsergebnisse an und wurde an Stelle der 60 Einzelwerte angegeben.

Zeigten sich nun bei den Zählungen Abweichungen, welche über das oben errechnete Fehlermaß hinausgingen, so wurde der Versuch wiederholt. Um pathologisch veränderte Hoden aus den Versuchsreihen fernzuhalten, wurden gleichzeitig Präparate für die histologische Untersuchung angefertigt. Auf diese Weise konnten einige Tiere mit Azoospermie und teilweiser Tubulusatrophie ausgeschieden werden. Nicht berücksichtigt wurden jedoch Schwankungen, welche durch die verschiedenartige Fütterung im Sommer und Winter oder auch durch die Temperaturunterschiede in den Stallungen bedingt sind. Hinzu kommt noch der M i s c h f e h l e r , der

sich trotz guten Umschüttelns der Präparate nicht ganz vermeiden läßt, denn zahlreiche Spermatozoen hängen noch in kleinen Haufen an Resten des Hodengewebes, wodurch eine gleichmäßige Verteilung in der Suspensionsflüssigkeit verhindert wird. Alle diese Fehler vergrößern noch die Schwankungen, die bei den einzelnen Tieren, aber auch selbst bei den beiden Hoden von ein und demselben Tier vorkommen, und auf die von fast allen Autoren immer wieder hingewiesen wird (M c K e n z i e , A l i f a n o w , A n d e r s o n u.a.m.).

V. Untersuchungsergebnisse

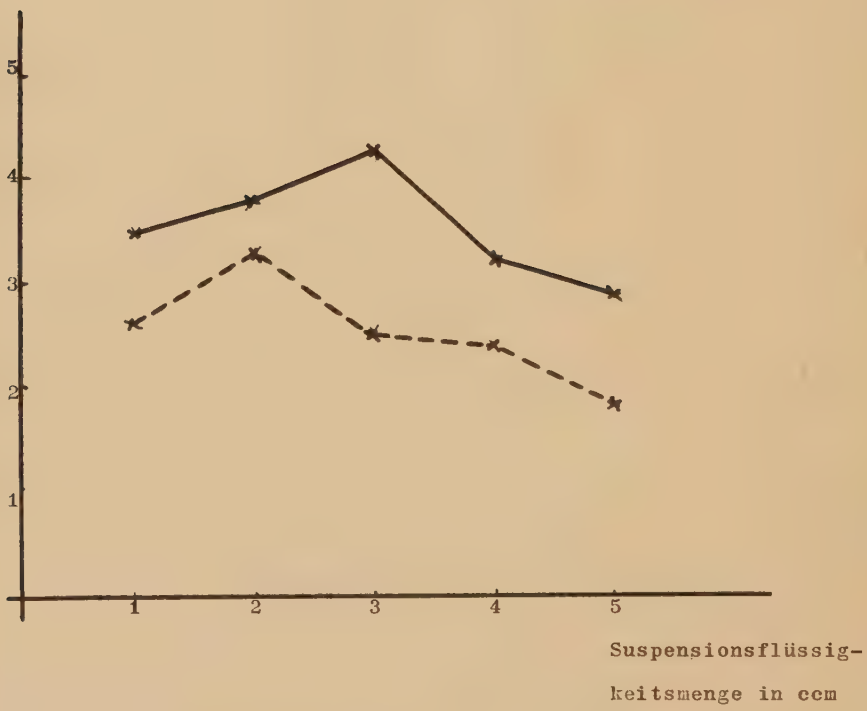
Unsere ersten Auszählungen dienten der Feststellung des Unterschiedes zwischen der Anzahl der gewonnenen Spermatozoen aus nicht geschüttelten und auf dem Rotationsschüttelapparat ausgeschüttelten Präparaten. Die freipräparierten Meerschweinchenhoden wurden sagittal in zwei Hälften geteilt und wie oben angegeben zerkleinert. Nun gaben wir die Suspensionsflüssigkeit (1 ccm, 2 ccm, 3 ccm, 4 ccm, 5 ccm) hinzu und schüttelten jeweils einen Hoden des Tieres aus, während wir den anderen nach kurzem Umschwenken sofort filtrierten. Jede der in der Tabelle aufgeführten Zahlen ist der Durchschnitt von vier ausgezählten Präparaten, so daß sich das Endergebnis dieser Versuchsreihe auf 152 Auszählungen stützt. Die Schütteldauer betrug 15 Minuten für jedes Präparat bei einer Tourenzahl der Schüttelapparatur von 120 Umdrehungen / Minute.

Schüttelzeit in Minuten	Anzahl der Spermatozoen pro ccm in Mill. bei verschiedener Suspensionsflüssigkeitsmenge					Durchschnitt in Mill. pro ccm
	1 ccm	2 ccm	3 ccm	4 ccm	5 ccm	
15	3,7	3,3	4,2	2,75	3,3	
15	3,3	4,9	4,15	3,9	3,1	
15	3,2	3,7	4,0	2,9	2,9	
15	3,9	3,3	4,8	-	2,5	
Durchschnitt	3,5	3,8	4,29	3,18	2,9	3,55
-	2,4	3,15	1,98	2,4	2,27	
-	2,6	3,15	2,5	2,7	1,3	
-	2,85	3,9	3,0	2,4	1,9	
-	-	2,9	2,65	2,3	1,8	
Durchschnitt	2,62	3,27	2,53	2,4	1,82	2,53

Tabelle 1 Gewonnene Spermatozoen aus nicht geschüttelten und ausgeschüttelten Hodenpräparaten vom Meerschweinchen.

Das Verhältnis der nicht ausgeschüttelten zu den ausgeschüttelten Präparaten beträgt 2,53 : 3,55 Mill. Da das Mehrergebnis der ausgeschüttelten Präparate die Schädigung der Spermatozoen durch dieses Verfahren (zahlreiche abgeknickte Köpfe) nicht aufwiegt, wurde bei den folgenden Präparationen das Ausschütteln im Schüttelapparat unterlassen.

Um die Ergebnisse aus Tabelle 1 anschaulicher zu machen, wurden sie in ein Koordinatensystem eingetragen und ergaben folgende Kurven:

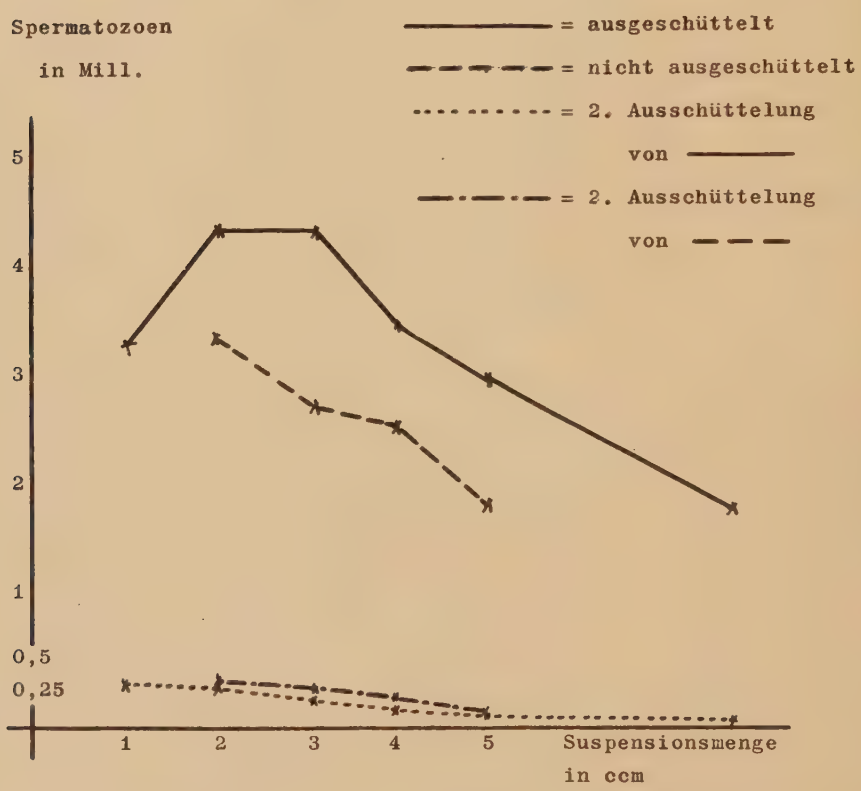


Ferner galt es festzustellen, wie hoch die Ausbeute bei der angewandten Gewinnungsmethode ist. Aus diesem Grunde wurde der nach dem Filtrieren im Filter verbliebene Rückstand erneut mit physiol. NaCl-Lösung versetzt, fünfzehn Minuten ausgeschüttelt und wiederum gefiltert. Dabei wurde berücksichtigt, ob das erste Präparat bereits ausgeschüttelt war oder nicht. Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse. Jede Zahl ist wieder der Durchschnitt von vier Auszählungen.

Verdünnung in ccm	Rüttelzeit in Min.	Zahl der gewonnenen Sperm.in Mill.	nochmal. Rüttelz.	Zahl der gewonnenen Sperm.in Mill.
1	15	3,3	15	0,4
1	15	3,2	15	0,3
2	15	4,9	15	0,2
2	15	3,7	15	0,4
3	15	4,15	15	0,15
3	15	4,0	15	0,25
3	15	4,8	15	0,25
4	15	3,9	15	0,1
4	15	2,9	15	0,17
5	15	3,1	15	0,1
5	15	2,9	15	0,1
7,5	15	1,7	15	0,1
7,5	15	1,7	15	0,05
Durchschnitt		3,4		0,19
2	-	3,15	15	0,35
2	-	3,15	15	0,4
2	-	3,9	15	0,3
2	-	2,9	15	0,4
3	-	2,5	15	0,15
3	-	3,0	15	0,45
3	-	2,65	15	0,27
4	-	2,4	15	0,27
4	-	2,7	15	0,1
4	-	2,4	15	0,27
5	-	2,27	15	0,1
5	-	1,3	15	0,25
5	-	1,9	15	0,1
Durchschnitt		2,63		0,26

Tabelle 2 **Feststellung des Ausbeutegrades durch Ausschütteln und Auszählen des Filtrierungsrückstandes.**

In der folgenden graphischen Darstellung sind die Ergebnisse aus Tabelle 2 eingetragen.



Das Verhältnis der ersten zur zweiten Auszählung ist bei den ausgeschüttelten Hodenpräparaten 3,4 : 0,19 oder 17 : 1 und bei den nicht ausgeschüttelten 2,6 ; 0,2 oder 10 : 1. Wir können also sagen, daß die Ausbeute der auf diese Weise gewonnenen Spermatozoen in beiden Fällen über 90 % beträgt.

Mit den nun folgenden Auszählungen beabsichtigen wir den Unterschied der Spermatozoendichte zwischen Rete testis und der Hodenperipherie festzustellen. Da wir nur die Anzahl der ausgeschwemmten Spermatozoen erfassen und angeben können und diese sicher nicht mit der wirklichen in den einzelnen Hodenabschnitten befindlichen Spermatozoenzahl übereinstimmt, so kommt es uns bei diesem Versuch hauptsächlich auf das Verhältnis Rete : Peripherie an. Bei der Versuchsanordnung wurde der Hoden in zwei Hälften geteilt, und zwar in eine dem Rete zugewandte und eine der Peripherie zugehörige Hälfte. Gleichzeitig präparierten wir den Nebenhoden derjenigen Tiere, welche in der Agonie nicht ejakuliert haben. Dabei wurden jedoch auch solche Tiere mitgezählt, die zwar nicht ejakuliert haben, deren ductus deferens aber mit Ejakulat angefüllt war. Ausgezählt wurden 20 Meerschweinchen- und 10 Rattenhoden. Als Suspensionsmenge wählten wir bei den Meerschweinchen 3 ccm und bei den Ratten 5 ccm physiol. NaCl-Lösung. Die Auszählungen ergaben die in den folgenden Tabellen verzeichneten Ergebnisse:

Suspensions-menge in ccm	Rete testis in Mill.	Peripherie in Mill.	Nebenhoden in Mill.
5	2,6	2,5	26,2
5	2,9	2,8	29,4
5	3,8	2,4	32,2
5	2,2	1,1	19,2
5	2,6	1,8	31,4
5	2,6	2,2	23,1
5	2,4	2,8	11,7
5	2,8	1,9	27,5
5	2,1	1,6	-
5	3,0	2,6	-
Durchschnitt	2,70	2,17	25,1

Tabelle 3 Unterschied zwischen der Spermatozoendichte in Rete - Peripherie - Nebenhoden bei der Ratte.

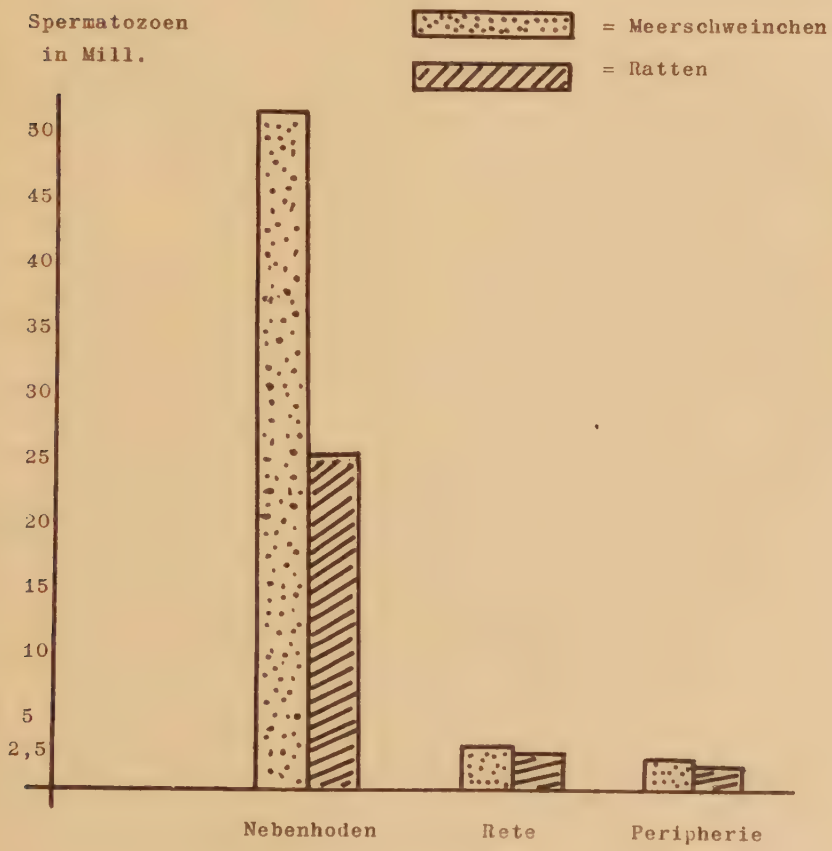
In der Tabelle 3 beträgt das Verhältnis rete : peripherie 2,7 : 2,17 und Hoden : Nebenhoden 4,87 : 25,1 Mill. Spermatozoen / ccm.

Suspensions-menge in ccm	rete testis in Mill.	peripherie in Mill.	Nebenhoden in Mill.
3	2,4	1,7	-
3	1,9	1,9	-
3	2,1	1,9	35,7
3	3,1	2,8	-
3	2,9	2,6	25,9
3	3,5	3,1	-
3	2,3	2,8	48,4
3	2,9	2,6	-
3	2,1	2,7	73,5
3	3,4	2,9	-
3	2,7	2,8	53,8
3	3,1	3,0	-
3	3,5	2,9	17,2
3	2,3	2,6	-
3	3,7	3,0	66,9
3	2,5	2,4	-
3	2,6	3,1	85,6
3	3,9	3,0	-
3	2,9	2,3	-
3	3,1	2,4	-
Durchschnitt	2,84	2,62	50,9

Tabelle 4 Unterschied zwischen der Spermatozoendichte in Rete - Peripherie und Nebenhoden bei Meerschweinchen.

Das Verhältnis Rete : Peripherie beträgt in dieser Tabelle 4 2,84 : 2,62 Mill., das Verhältnis Hoden : Nebenhoden 5,46 : 50,9 Mill. oder 1 : 10.

Die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen sind in das nun folgende Koordinatensystem eingetragen:



Weitere Untersuchungen dienten der Feststellung, wie die Ausbeute bei Verwendung von 1/1, 1/2 und 1/4 Hoden bei Meerschweinchen ist. Zum Vergleich stellten wir dieselben Versuche mit 25 Hundehoden an. Es wurden bei den beiden

Tierarten die Hoden bzw. Hodenteile mit 5 ccm Suspensionslösung versetzt. Die Auszählungen ergaben folgende Durchschnittswerte:

Hodenteil	Mill.pro ccm	Mill.pro Suspension	Umgerechnet, Mill. pro Hoden
1/4	1,3	6,5	26,0
1/2	1,7	8,5	17,0
1/1	2,8	14,0	14,0

Tabelle 5 Feststellung des Ausbeutegrades bei 1/4, 1/2 und 1/1 Hoden von Meerschweinchen.

Hodenteil	Mill. pro ccm	Mill. pro Suspension	Umgerechnet, Mill. pro Hoden
1/8	3,77	18,85	150,8
1/4	5,58	27,9	111,6
1/2	10,11	50,55	101,1

Tabelle 6 Feststellung des Ausbeutegrades bei 1/8, 1/4 und 1/2 Hoden von Hunden.

Bei diesen Tabellen kam es nicht so sehr darauf an, möglichst genau festzustellen, wieviel Spermatozoen aus 1/4, 1/2 oder 1/1 Hoden gewonnen werden können, sondern es sollte vielmehr der Grad der Ausbeute bei 1/4 Hoden im Vergleich zu dem bei 1/2 und 1/1 Hoden deutlich gemacht werden. Es genügte, den Durchschnitt von je 25 Tieren zu nehmen, da bei dieser Anzahl der Unterschied schon sehr deutlich zu Tage tritt. Während wir bei 1/4 Meerschweinchenhoden 1,3 Mill. Spermatozoen pro ccm feststellten, waren es in 1/2 Hoden nur 1,7 und in 1/1 Hoden nur 2,8 Mill. Ich schreibe n u r , weil man aus 1/2 Hoden eigentlich doppelt so viel Spermatozoen erwartet wie aus 1/4 Hoden. Wie man jedoch erkennen kann, ist die Ausbeute um so größer, je kleiner der verwendete Hodenteil war. Dieses geht aus der letzten Spalte der Tabelle deutlich hervor. Bezieht man nämlich die Auszählungsergebnisse auf 1/1 Meerschweinchenhoden, so erhält man für 4/4 Hoden 26,0 Mill. Spermatozoen, während 2/2 Hoden nur 17,0 Mill. und 1/1 Hoden 14,0 Mill. ergeben. Dieses Ergebnis läßt nun vermuten, daß die größere Menge an Suspensionsflüssigkeit im Verhältnis zu der jeweiligen Hodensubstanzmenge die Ursache für die bessere Ausbeute ist. Dieser Untersuchung dienten die folgenden Versuche. Wir verwendeten dabei 1/2 Meerschweinchenhoden und zum Vergleich 1/8 Hundehoden. Verdünnt wurde bei den Meerschweinchen mit 1; 2; 3; 4 und 5 ccm physiol. NaCl-Lösung und bei den Hundehoden mit 1; 2; 3; 4; 5; und 7 ccm Kochsalzlösung. Die in den folgenden beiden Koordinatensystemen eingetragenen Werte sind der Durchschnitt von 175 Auszählungen:

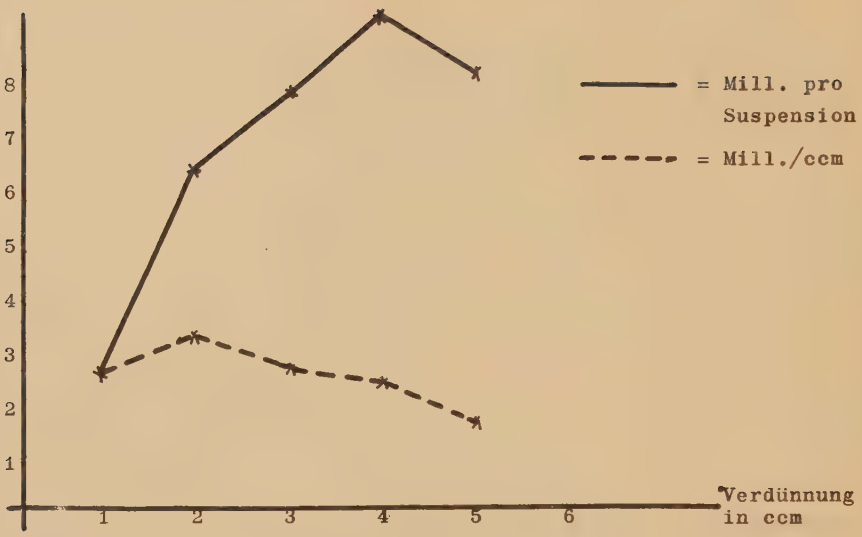


Tabelle 7 Anzahl der gewonnenen Spermatozoen bei verschiedenen Verdünnungen aus 1/2 Meerschweinchenhoden.

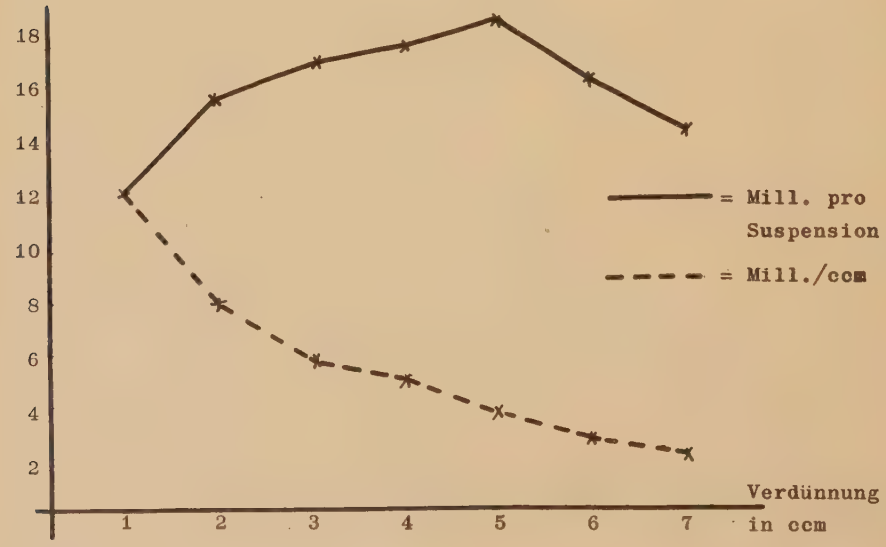


Tabelle 7a Anzahl der gewonnenen Spermatozoen bei verschiedenen Verdünnungen aus 1/8 Hundehoden.

Die Annahme, daß die Menge der Suspensionsflüssigkeit die Ursache für eine bessere Spermatozoenausbeute ist, hat sich nur zum Teil bestätigt. Wie aus den Koordinatensystemen ersichtlich ist, müssen wir zunächst einen Unterschied machen zwischen der Anzahl der Spermatozoen, welche sich in der Suspensionsflüssigkeit befinden und der Spermatozoenmenge pro ccm. Wichtig ist für unsere Versuche die gewonnene Spermienzahl. Diese erhöht sich zunächst bei zunehmender Verdünnung, jedoch nur bis zu einer bestimmten Grenze. Wird darüber hinaus noch weitere Suspensionsflüssigkeit hinzugegeben, so fällt die Zahl der gewonnenen Spermatozoen wieder langsam ab. Dieser Zahlenabfall dürfte jedoch in Wirklichkeit nicht oder kaum vorhanden sein und ist wahrscheinlich eher als ein Zählfehler zu betrachten, bedingt durch die große Verdünnung und den dadurch mehr ins Gewicht fallenden Verteilungsfehler. Wichtig erscheint auch die Feststellung, daß über den Kulminationspunkt hinaus, der bei 1/2 Meerschweinchenhoden um 4 ccm und bei 1/8 Hundehoden um 5 ccm Flüssigkeit liegt, keine wesentliche Steigerung der Spermatozoenzahl in der Suspension bei der angewandten Präparationsmethode stattfindet.

Da die einzelnen Hoden untereinander in Bezug auf Größe und Gewicht nicht gleich sind, galt es nun festzustellen, welchen Einfluß das Gewicht der jeweiligen Hodensubstanz auf die Anzahl der gewonnenen Spermatozoen ausübt. Bei dieser neuen Versuchsanordnung wurde der Hoden bzw. Hodenteil vor der Zerkleinerung gewogen. Die Auszählung von 36 Meerschweinchenhoden und 32 Hundehoden ergab folgende Tabelle:

Hodengewicht in Gramm	Anzahl d.Sperm. in Mill. pro ccm	Umgerechnet auf 1 gr. Substanz	Verdünnung in ccm	Durchschnitt in Mill./ccm
0,466	3,15	6,7	2	
0,419	3,15	7,5	2	
0,474	3,9	8,2	2	
0,406	2,9	7,1	2	7,4
0,569	2,9	5,1	3	
0,636	3,15	4,9	3	
0,556	2,7	4,9	3	5,0
0,616	1,3	2,1	5	
0,590	1,9	3,2	5	2,6

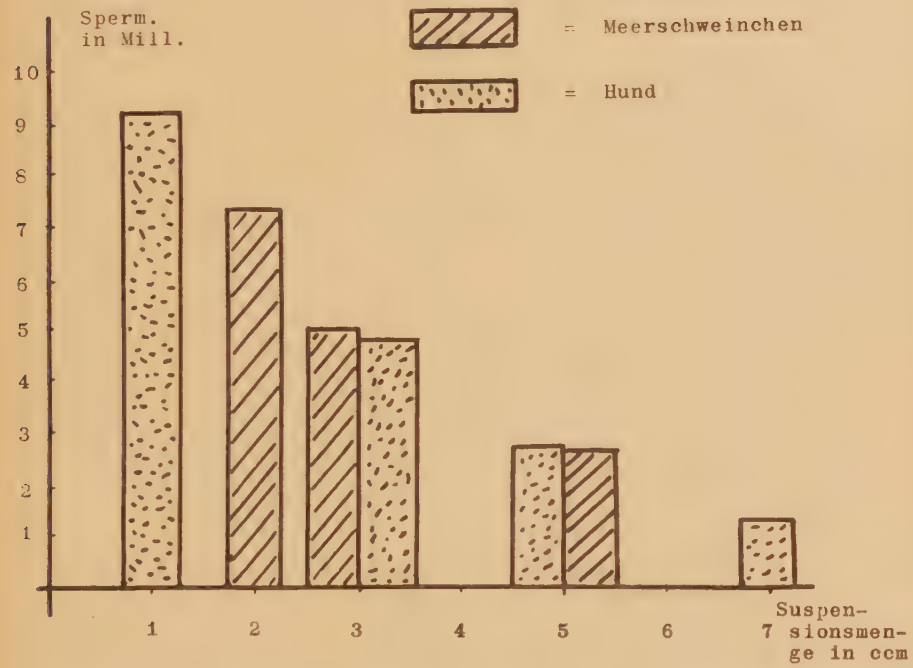
Tabelle 8 Anzahl der gewonnenen Spermatozoen bei verschiedenen Verdünnungen unter Berücksichtigung des Hodengewichtes beim Meerschweinchen.

Jede Zahl (Gewicht und Auszählung) ist das Mittel von vier Auszählungen. In der nun folgenden Tabelle 9 ist jede Zahl der Durchschnitt von acht Untersuchungen.

Gewicht der Hoden-substanz i. Gramm	Anzahl d.Sperm. pro ccm i. Mill.	Verdünnung in ccm.	Umgerechnet auf 1 Gramm in Mill./ccm
1,397	13,0	1	9,3
1,28	5,6	3	4,8
1,37	3,7	5	2,7
1,37	1,8	7	1,3

Tabelle 9 Anzahl der gewonnenen Spermatozoen bei verschiedenen Verdünnungen unter Berücksichtigung des Hodengewichtes bei

Die Ergebnisse beider Auszählungsreihen in einem Koordinatensystem dargestellt ergeben folgendes Bild:



Da die verschiedenen Hodengewichte weder auf der Ordinate noch auf der Abszisse angebracht werden konnten, wurden alle Werte auf ein Gramm Hodensubstanz bezogen und sind somit in der Darstellung enthalten.

Es ist nun jedoch nicht gleichgültig, wie in der Tabelle 5 und 6 festgestellt wurde, ob zur Auszählung ein großes Stück Hoden, (1/1 oder 1/2) oder aber ein kleiner Hodenteil verwendet wurde. Diese Tatsache berücksichtigten wir bei der letzten Tabelle nicht. Durch die folgende letzte Versuchsanordnung wurde dieser Faktor berücksichtigt. Zu diesem Zweck wurden 1/8 Hundehoden mit einem durchschnittlichen Gewicht von 1,4 Gramm, 1/4 Hoden mit durchschnittlich 2,5 Gramm und 1/2 Hundehoden mit rund

5,5 Gramm im Durchschnitt in 5 ccm physiol. NaCl-Lösung suspendiert. Die Auszählungen ergaben folgenden Durchschnitt von 22 Tieren:

Verdünnung in ccm	Hodenteil	Durchschn. Gewicht i. Gramm	Durchschn. Anzahl in Mill./ccm	Durchschn. Anzahl pro Gramm in Mill.	Streuung
5	1/8	1,366	3,72	2,72	2,31-2,98
5	1/4	2,523	6,01	2,38	2,05-2,76
5	1/2	5,460	11,53	2,11	1,92-2,27

Tabelle 10 Auszählung von 1/8, 1/4 und 1/2 Hundehoden unter Berücksichtigung von Gewicht und Hodenteil.

Bei dieser Versuchsanordnung konnten wir feststellen, daß die Ausbeute aus 1/8 Hoden im Durchschnitt um rund 600 000 Spermatozoen höher liegt als bei 1/2 Hoden. Wir fanden also die Tatsache in den Tabellen 5 und 6 erneut bestätigt, daß die Ausbeute um so besser ist, je kleiner der verarbeitete Hodenteil war.

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an Ratten-, Meerschweinchen- und Hundehoden durchgeführt mit der Frage, ob Hodenspermatozoen im Hinblick auf die erforderliche Zahl für eine evtl. homologe künstliche Insemination verwendet werden können.

Für unsere Untersuchungen wurden die Hoden von 104 Meerschweinchen, 38 Ratten und 20 Hunden präpariert und ausgezählt. Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

1) Als günstigste Gewinnungsmethode stellte sich folgendes Verfahren heraus: Die Hoden bzw. Hodenteile wurden durch eine bestimmte Anzahl von Scherenschnitten zerkleinert, mit physiol. NaCl-Lösung aufgeschwemmt, und die Aufschwemmung durch einen Mullfilter gegossen und ausgedrückt.

2) Andere Gewinnungsmethoden - z.B. die Hodenpunktion - wurden versucht und ergaben nur sehr niedrige Spermatozoenzahlen, so daß diese Methoden zur Gewinnung von Hodenspermatozoen für eine künstliche Insemination nicht geeignet sind.

3) Die Auszählungen wurden von zwei Untersuchern vorgenommen. Zur Verwendung kamen nur geeichte Leukozytenpipetten und die Bürker'sche Zählkammer. Ausgezählt wurden jeweils 2 x 25 1/25 mm große Quadrate und die Ergebnisse mit 50 000 multipliziert.

4) Mögliche Fehlerquellen wurden berücksichtigt und der individuelle Fehler mit der Fehlerberechnungsformel nach B u r n ermittelt. Der mittlere Fehler der Einzelmessung betrug etwa 330 000 Spermatozoen.

5) Zur Feststellung der günstigsten Gewinnungsmethode wurden Hodenpräparate, die auf dem Rotationsschüttelapparat ausgeschüttelt waren, und nicht ausgeschüttelte Präparate untersucht. Das Verhältnis der ausgeschüttelten zu den nicht ausgeschüttelten Hodenpräparaten betrug beim Meerschweinchen 3,55 : 2,53 Mill. Spermatozoen / ccm. Das günstigere Ergebnis beim Ausschütteln wurde durch die dabei entstehenden Schädigungen an den Samenzellen beeinträchtigt.

6) Der Ausbeutegrad bei der angewandten Gewinnungsmethode konnte durch nochmaliges Suspendieren, Ausschütteln und Auszählen des Filtrierungsrückstandes ermittelt werden. Er betrug über 90 %.

7) Um das Dichteverhältnis der Spermien in der Hodenperipherie zum Rete testis und zum Nebenhoden bei Ratten und Meerschweinchen zu bestimmen, wurden 20 Meerschweinchen- und 10 Rattenhoden entsprechend präpariert und ausgezählt. Das Verhältnis Peripherie : Rete : Nebenhoden betrug bei den Ratten 2,17: 2,7 : 25,1 und bei den Meerschweinchen 2,62 : 2,84 : 50,9 Mill. Spermatozoen / ccm.

8) Weitere Untersuchungen ergaben, daß der Ausbeutegrad um so größer ist, je kleiner der verwendete Hodenteil war. Aus 4/4 Hoden konnten bei 25 Meerschweinchen im Durchschnitt 26 Mill. Spermatozoen gewonnen werden, dagegen aus 2/2 Hoden nur 17,0 Mill. und aus 1/1 Hoden lediglich 14 Mill. Spermatozoen.

9) Die Menge der Suspensionsflüssigkeit, welche zur Ausschwemmung der Spermatozoen verwendet wurde, hat einen Einfluß auf die Zahl der gewonnenen Samenzellen. Die optimale Menge an Extraktionsflüssigkeit lag bei Verwendung eines halben Meerschweinchenhodens um 4 ccm, bei 1/8 Hundehoden um 5 ccm. Wurde mehr als die eben angegebene Flüssigkeitsmenge zugegeben, so konnte dadurch die Zahl der ausgeschwemmten Spermatozoen nicht erhöht werden.

10) Aus 1 Gramm Hodensubstanz eines Meerschweinchenhodens konnte bei Verwendung der für diese Größe der Hodenmasse optimalen Extraktionsflüssigkeitsmenge von 3 ccm 5,0 Mill. Spermatozoen/ccm gewonnen werden. Bei Verwendung von 1 Gramm Hundehoden und 3 ccm wurden 4,8 Mill. Spermatozoen/ccm erzielt.

11) Bei Verwendung von 1/8 Hundehoden mit einem durchschnittlichen Gewicht von 1,366 Gramm und 5 ccm Suspensionsflüssigkeit wurden 3,72 Mill. Spermatozoen/ccm gewonnen. Das sind 2,72 Mill./ccm bei einem Gramm Hodensubstanz. Wurde 1/4 Hundehoden mit einem Durchschnittsgewicht von 2,523 Gramm in gleicher Weise präpariert, so ergab die Auszählung 6,01 Mill. Spermatozoen/ccm oder 2,38 Mill. Spermatozoen/ccm bei einem Gramm Hodensubstanz. 1/2 Hundehoden mit einem Durchschnittsgewicht von 5,460 Gramm lieferte unter gleichen Bedingungen 11,53 Mill. Spermatozoen/ccm, das sind 2,11 Mill./ccm bei einem Gramm Hodenmasse. Wir fanden hiermit die Ergebnisse in den Tabellen 5 und 6 erneut bestätigt, daß die Ausbeute um so besser ist, je kleiner der verarbeitete Hodenteil war.

Ob die mit den neuen Gewinnungsmethoden erreichte relativ hohe Zahl von Hodenspermien für eine künstliche Insemination ausreichend ist, kann erst durch weitere Untersuchungen mit tierexperimentellen künstlichen Inseminationen festgestellt werden.

Es ist mir am Ende dieser Arbeit eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. med. H. S c h u e r m a n n für die Überlassung des Themas sowie die großzügige Erlaubnis, in der Klinik arbeiten zu dürfen, meinen besonderen Dank auszusprechen.

Ferner möchte ich Herrn Dr. R. D o e p f m e r für seine Mühe und vielen guten Ratschläge sowie Herrn Dr. Gregorczyk für seine freundlichen Anregungen herzlichst danken.

Literatur

Alifanow, F.G.	1933 - 34 Itogi rab. I -go usesojuz sovesc. iskusst osem: 118, 1935. Abstract in A.B.A.
Anderson, J.	The semen of animals and its use for artificial insemination, Edinburgh 9, Scotland 1945.
Barton, M. and Wiesner, B.P.	Zitiert nach Knaus.
Belding, D.L.	1934, Amer. J. Obstet. Gynec. 27, 25.
Belonoschkin, B.	Zeugung beim Menschen, Stockholm 1949, Sjöbergs Förlag.
Brunner, M. Grenley, B. Hotchkiss, R.S.	Semen Analyses of Two Hundred Fertile Men. Amer. Jour. Med. Sci. 196, 362, 1938.
Burn, J.	Biologische Auswertungsmethoden, Springer-verlag 1937.
Chang, N.C.	Fertility and Sterility 2, 205, 1951
Davis, H.P. Underbjerg, G.K.L. Williams, N.K.	J. Dairy Sci. 23, 1057, 1940.
Davis, H.P. Williams, N.K.	Proc. Amer. Soc. Anim. Prod. 32nd Ann. Meet. 232, 1939.

Doepfmer, R. — Zur Kenntnis der Aspermie, Habilitationsarbeit, Würzburg 1955.

Edwards, J. — Proc. roy, soc. B. 128, 407, 1940.

Goetze, R. — Die Besamung und Unfruchtbarkeit bei Haussäugetieren, Schaper, Hannover 1949.

Hamm, J. — Zitiert nach Joël.

Herman, H.A.
Ragsdale, A.C. — Bull. Mo.agric. Exp. Sta. No.326, 1939.

Hotchkiss, R.S. — Fertility in men. J.B. Lippinkott Co., Philadelphia 1944.

Jackson, M.H.
Harvey — Variations in Spermatogenesis of oligospermic men. Nature, 162, 67, 1948.

Joël, C.A. — Studien am menschlichen Sperma, Schwabe und Co., Basel 1953.

Kennedy, G.C.
Richards, N.A.
Bishop, P.M.F. — Variability of the Sperm. Count, Brit. Med. Journ. March 17, 1951.

Knaus, H. — Die Physiologie der Zeugung des Menschen, Maudrich Wien 1950.

Koelliker — Zitiert nach Joël.

Lagerlöf, N. — Acta path. et microbiol. scand. (Dän) Suppl. 19, 1, 1934.

Lambert, W.V.
McKenzie, F.F. — Circ. U.S. Dep. Agric. No.567, 1940.

Leeuwenhoek	Zitiert nach Joël.
Lode, A.	Pflügers Arch. 50, 278, 1891.
Macomber, D. Saunders, W.B.	The Spermatozoa Count, New Eng. Med. Jour. 200, 981, 1929.
McKenzie, F.F.	1931 J. Amer. vet. med. Ass. 78, 244.
McLeod, J. Gold, R.Z.	The male factor in fertility and infertility II. Spermatozoön counts in 1 000 men of infertile marriage. The Journal of Urologie 66: 436, 1951.
McLeod, J. Hotchkiss, R.S.	J. of Urol. 48, 225, 1942.
Meaker, S.R.	Human Sterility, Baltimore, Williams and Williams Co, 1937.
Milovanow, V.K.	1934 Iskusstvennoe osemenenie s.-h. zivotnyh. (Artificial insemination of Livestock) Moscow - Leningrad: State Publishing House. Review in A.B.A. 1934, 2: 403. Osnovy iskusstvemogo osemenenija (Prinziples of artificial insemination) Moscow - Leningrad, State Publishing House, 1934.
Moench, G.L.	Considerations of some aspects of sterility. Amer. Jour. Obs. and Gyn. 32: 3, 1936.
Morikard	Zitiert nach Knaus.

Posner, C.	Die diagnostische Hodenpunktion, Berl. klin. Woch. 42: 1119, 1905.
Prévost Dumas	1824 Ann. des Sci. Nat. vol. 2.
Reichert, K.B.	Müllers Archiv, 1847.
Schneerson, S.S.	1936 Sborn. Trud. zooteh. Kaf. Zitiert nach Anderson.
Schultze, G.K.F.	Zbl. f. Gyn. 1941, 988.
Serge, G.V. Valle	Studi sulla fertilità. Sulla biopàtologica del nemasperma umano, Ginecologica 1, 925, 1935.
Spallanzani	Expériences pour servis à l'histoire de la Génération des Animaux et des Plantes, Geneva, 1786.
Stiasny, H.	Unfruchtbarkeit beim Manne, Enke Stuttgart, 1944.
Walton, A.	The Relation betwenn Density of Sperm-suspension and Fertility as Determined by Artificial Insemination of Rabbits. S. 303 Royal Society of London, S.B. 1927.
Zähle, D.	Die Spermadichte im Hoden und in den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens beim Bullen. Diss. 1947. U 45/48, 6095, Hannover.

Lebenslauf

Am 19. August 1928 wurde ich als Sohn des Bankbeamten Klemens Große Segerath und seiner Gattin Margarethe, geb. Geißler, in Oberhausen-Osterfeld geboren. Dort ging ich auch von Ostern 1935 bis Ostern 1939 zur Volksschule und besuchte bis zu meiner Einberufung zum Wehrdienst im Januar 1944 das Staatliche Gymnasium in Oberhausen / Rhld. Nach meiner Entlassung aus der Gefangenschaft bereitete ich mich am Naturwissenschaftlichen Gymnasium in Oberhausen auf das Abitur vor und bestand Ostern 1950 die Reifeprüfung.

Zum Sommersemester 1951 wurde ich für das Studium der Zahnheilkunde an der Universität Würzburg zugelassen, bestand im Juli 1953 die zahnärztliche Vorprüfung und beendete am 23. März 1956 die zahnärztliche Prüfung. Seit März 1954 arbeite ich in der Universitätsklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten Würzburg an meiner Dissertation und bin seit Mai 1956 als Assistent bei einem praktischen Zahnarzt tätig.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Werner Große Segerath

RUDOLF BAEHR DRUCK- UND WERBETECHNIK
WÜRZBURG SCHOPPSTRASSE 3